



Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol *in vitro*

Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria to reduce *in vitro* cholesterol

Clementina Cueto*, Stephania Aragón

Facultad de Ingeniería, Maestría en Diseño y Gestión de Procesos, Universidad de La Sabana. Campus Universitario del Puente del Común, Km. 7, Autopista Norte de Bogotá. Chía, Cundinamarca, Colombia.

Recibido 26 noviembre 2011; aceptado 20 febrero 2012

Resumen

El consumo diario de alimentos probióticos reduce los niveles de colesterol sérico en un 3%, valor significativo para la prevención de la hipercolesterolemia, factor de riesgo de enfermedad cardiovascular y causal de mortalidad. Algunas especies del género *Lactobacillus*, utilizadas en la industria alimentaria como probiótico, reducen el colesterol sérico por dos mecanismos, la adsorción de colesterol y producción de la enzima hidrolasa de sales biliares. El objetivo del estudio fue evaluar el potencial probiótico de un grupo de bacterias lácticas aisladas de suero costeño. Se aislaron 53 cepas a partir de nueve muestras de suero costeño; el potencial probiótico de las bacterias se evaluó por tolerancia a pH 2.0, 0.3% de sales biliares y sensibilidad a vancomicina y cefoxitin. Se seleccionaron cinco microorganismos y se identificaron molecularmente, como *Lactobacillus fermentum*. La capacidad de adsorber el colesterol medida por el método de Kimoto, presentó disminución de $53.06 \pm 2.69 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para la cepa K73 y $7.23 \pm 2.69 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para la cepa K75. Esas mismas cepas mostraron la mayor actividad total y específica de la enzima. Los resultados evidenciaron que no existe relación entre la producción de la enzima y la adsorción del colesterol. La cepa con mayor potencial probiótico fue K73. La propiedad hipocolesterolemia de *Lactobacillus fermentum*, podría ser el inicio de la búsqueda de matrices alimentarias que permitan disminuir los niveles del colesterol sérico y adicione valor agregado al producto.

Palabras clave: *Lactobacillus*, enfermedades cardiovasculares, hidrolasa sales biliares, reducción colesterol.

Abstract

Daily consumption of probiotics reduce levels of serum cholesterol by up to 3%, which is significant to prevent hypercholesterolemia, a risk factor for cardiovascular disease and cause of mortality. The genus *Lactobacillus* is used in industry as a probiotic and some species reduce serum cholesterol by two mechanisms, the adsorption of cholesterol and the production of the enzyme bile salt hydrolase, which vary according to species. The aim of the study was to assess the ability of probiotic bacteria group isolated from coast serum. 53 strains were isolated from nine coastal serum sample; the sensitivity to cefoxitin and vancomycin, and the tolerance to pH 2.0 and 0.3% bile salts were evaluated to determine its probiotic potential. Five microorganisms were selected and molecularly identified as *Lactobacillus fermentum*. The ability to absorb cholesterol measured by the method of Kimoto, showed a reduction of $53.06 \pm 2.69 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for strain K73 and $7.23 \pm 2.69 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for K75. These same strains showed the highest total and specific activity of the enzyme. The results didn't show a relationship between the production of enzyme and adsorption of cholesterol. The strain with the greatest probiotic potential was K73. This hypocholesterolemic property will give strains added value to start the search for food matrices that allow decreasing serum cholesterol levels.

Keywords: *Lactobacillus*, cardiovascular disease, enzyme bile salt hydrolase, cholesterol reduction.

1. Introducción

En Colombia, según el Informe del Ministerio de la Protección Social (2007),

la enfermedad cardiovascular es la causa principal de muerte, tanto en hombres como en mujeres mayores de 45 años, e

* Autor para correspondencia

Email: maria.cueto@unisabana.edu.co (C. Cueto)

incluso supera las muertes violentas o por cánceres combinados. En países desarrollados, el 70% de la población está en riesgo de desarrollar enfermedades de origen cardíaco (Roth, 2010), la cual se encuentra sin tratamiento a pesar de que éste es económico y de fácil acceso, por lo que se están promoviendo actividades de prevención, que incluyen disminuir el uso de tabaco, realizar actividad física y consumir alimentos saludables.

Entre los alimentos saludables están los enriquecidos con microorganismos probióticos como bacterias ácido lácticas (BAL), y se ha visto que uno de los principales beneficios sobre la salud del consumidor probablemente sea la reducción de colesterol sérico (Pereira *et al.* 2003).

Se han realizado algunos estudios de cepas bacterianas con potencial reductor de colesterol y conocido algunos mecanismos que logran esta reducción como son la desconjugación de las sales biliares por acción de la enzima hidrolasa (BSH) (E.C. 3.5.1.24) activa en muchas especies BAL (Lye *et al.*, 2010) y la absorción del colesterol en el lumen intestinal. La adsorción de colesterol incrementa su demanda para la síntesis de nuevos ácidos biliares o por reducción de la solubilidad del colesterol. Algunos autores han reportado la capacidad de las bacterias de incorporar a la membrana o adherir colesterol a la superficie, reduciendo la disponibilidad para su absorción intestinal y posterior pase a la sangre (Belviso *et al.*, 2009).

El presente estudio evaluó el potencial probiótico, de cinco BAL aisladas de matrices lácteas de productos autóctonos colombianos, para adsorber colesterol y desconjugar las sales biliares, a través de pruebas *in vitro* como con posterior aplicación a nivel industrial en el diseño y desarrollo de productos alimenticios.

2. Material y métodos

Aislamientos de cepas de *Lactobacillus*

Se realizaron aislamientos de cepas de *Lactobacillus* a partir de nueve muestras de

suero costeño, provenientes de los departamentos de Sucre y Córdoba (Colombia) (Cueto *et al.*, 2007). Como referencia se utilizaron las cepas *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (Liong y Shah, 2005) y *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 (Gardiner *et al.*, 2002) provenientes del cepario de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de La Sabana (Chía, Cundinamarca, Colombia). Los aislamientos se conservaron a -80°C en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) y 30% de glicerol (v/v). Las bacterias fueron incubadas 24 h en medio MRS en condiciones aeróbicas a 37°C, antes de realizar los ensayos.

Simulación de tolerancia a jugo gástrico y sales biliares

La resistencia a pH 2.0 y la tolerancia a sales biliares se determinó según metodología propuesta por (Guo *et al.*, 2010). Se ajustó el pH a 2.0 del caldo MRS con HCl 6M, se inoculó 100 µL del microorganismo a evaluar, se incubó por 2 h a 37°C y se realizó un recuento inicial en placa del cultivo y uno después de las 2 h de incubación. La tolerancia a sales biliares se realizó enriqueciendo el caldo MRS con 0.3% sales biliares (Sigma B8756) e inoculando 100 µL de la cepa a evaluar, se incubó por 2 h a 37°C y se realizó un recuento en placa inicial del cultivo y uno después de las 2 h de incubación. El porcentaje de supervivencia fue calculado mediante la siguiente ecuación (1):

$$(\%) = \frac{\log \text{UFC } N_1}{\log \text{UFC } N_0} \times 100 \quad (1)$$

Donde N_1 representa el total de células viables después del tratamiento y N_0 el número inicial microorganismos inoculados (Bao *et al.*, 2010).

Determinación de la resistencia a antibióticos de importancia epidemiológica

Se realizó la prueba de difusión agar, con cepas cultivadas en caldo MRS a 37°C durante 8 h y recogidas las células por centrifugación. Se evaluó la sensibilidad de las células a antibióticos vancomicina y cefoxitin en placa, incubación a 37°C por

24 h y luego se determinó el diámetro de inhibición.

Identificación molecular de cepas de *Lactobacillus*

La extracción de ADN bacteriano se realizó mediante el Kit UltraClean™ Microbial DNA Isolation (Mo Bio Laboratories). Se amplificaron 700 pb de la región 16s RNA, empleando los primers: 27 F: 5`- GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3`, 787 R: 5`CTA CCA GGG TAT CTA AT - 3` (Mori *et al.*, 1997). Los amplímeros se secuenciaron y analizaron bioinformáticamente mediante los programas CLUSTALW y BLAST.

Actividad de la enzima hidrolasa de sales biliares (BSH)

La actividad de la enzima BSH se realizó según método de (Liong y Shah, 2005). El contenido de proteínas fue cuantificado por el método de ácido bicinónico (Sigma), con lectura de absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas se calculó basada en la curva de calibración con albúmina 1 mg.L⁻¹.

Adsorción de colesterol

La disminución de colesterol del medio de cultivo se determinó siguiendo la propuesta de Kimoto *et al.* (2002); se utilizó cultivos en caldo MRS con 0.2% (p/v) de tioglicolato, suplementado con 0.2% de tauracolato y glucolato de sodio como

sales biliares y con adición de una solución de colesterol para concentración final de 70 µg.ml⁻¹.

Análisis estadístico

Los ensayos fueron analizados por triplicado. Los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA a un nivel de significancia de 5% (p<0.05). Se utilizó el programa estadístico Statgraphics Plus ®.

3. Resultados y discusión

Los criterios de selección para definir a un microorganismo con potencial probiótico para este estudio fueron: tolerancia a sales biliares y a pH menores a 3.0, presentar sensibilidad ante antibióticos de importancia epidemiológica (FAO, 2002), y disminuir el colesterol sérico (Lye *et al.*, 2010).

Simulación de tolerancia a jugo gástrico y sales biliares

Se aislaron 53 cepas, 29 sobrevivieron a la exposición de 2 h a pH 2.0 y 26 toleraron la condición a 0.3% de sales biliares durante el mismo periodo de tiempo. A pH 2.0 hubo una disminución en promedio de 3 ciclos log y en medio adicionado con 0.3% de sales biliares de 4 ciclos log, partiendo de un recuento inicial de 9.0 UFC/mL. El promedio de supervivencia de las cepas en el medio ajustado a pH 2.0 fue de 54% y 63% el obtenido en el medio 0.3% de sales biliares (Tabla 1).

Tabla 1

Porcentaje de supervivencia de las cepas seleccionadas según tolerancia a pH 2.0 y sales biliares (0.3%).

Cepa	Recuento inicial (log UFC.mL ⁻¹)	Tolerancia pH 2.0		Tolerancia a sales biliares (0.3%)	
		2h	% de supervivencia	2h	% de supervivencia
I_1	9.4± 0.1 ^a	6.0±0.4	64.1	44.4±0.1	47.2
K11	8.8± 0.1 ^a	3.9±0.2	44.1	3.1±0.5	35.0
K72	9.3±0.2 ^a	7.2±0.2	77.7	5.0±0.1	54.1
K73	9.1±0.1 ^a	6.5±0.0	71.8	3.8±0.6	42.5
K75	8.9±0.0 ^a	7.2±0.2	77.4	45.05±0.5	50.0

^a Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas para $\alpha=0.05$.

Del análisis de resistencia a pH 2.0 y tolerancia a sales biliares 0.3%, condiciones que afectan la supervivencia bacteriana durante su paso a través de un modelo in vitro del tracto gastrointestinal durante las 2 h que tarda la comida en atravesar el sistema (Urbanska *et al.*, 2007), se observó que el 48.6% de las cepas estudiadas fueron capaces de sobrevivir a las condiciones propuestas por el estudio.

De las cepas seleccionadas como microorganismos con potencial probiótico, la cepa K72 fue la que presentó mayor tolerancia ante las condiciones de pH 2.0 y sales biliares 0.3%, disminuyendo en promedio 2.1 ± 0.2 unidades logarítmicas y la cepa que presentó menor tolerancia fue K11 disminuyendo en promedio 4.9 ± 0.2 unidades logarítmicas. Los resultados presentados en la Tabla 1 son consistentes con los reportados por (Vizoso *et al.*, 2006), quienes evalúan el comportamiento de las cepas de *Lactobacillus* aisladas de heces fecales en niños y en productos lácteos fermentados típicos de Kenia, observando una disminución entre 2 y 3 unidades logarítmicas.

Resistencia a antibióticos de importancia epidemiológica

Se seleccionaron las 26 cepas que toleraron simultáneamente las condiciones de pH 2.0 y 0.3% de sales biliares para realizar el análisis de resistencia a antibióticos y cinco cepas fueron sensibles ante vancomicina y cefoxitín. Estas se identificaron molecularmente mediante análisis bioinformático; se obtuvieron secuencias en promedio de 773.8 ± 36.6 pb de los amplímeros de la región 16S RNA. La totalidad de las cepas evaluadas presentó homología del $87.3 \pm 3.3\%$ frente a *Lactobacillus fermentum*.

La resistencia ante los antibióticos es un creciente problema por ser fácilmente transferible entre microorganismos. Hummel *et al.* (2007) reportan que la resistencia a cefoxitín genera mutaciones puntuales que confieren resistencia adicional a las quinolonas obligando a los

hospederos, el consumo de antibióticos nefrotóxicos. También importa prevenir la generación de *Enterococcus vancomicina* resistentes, agentes de infecciones nosocomiales, quienes adquieren la resistencia por mecanismos de transferencia horizontal y cuyas patologías adyacentes son de mal pronóstico clínico (Ray *et al.*, 2003), razón por la cual, las cepas que manifestaron resistencia a los antibióticos fueron excluidas del estudio.

Actividad de la enzima BSH

Las cepas 1_1, K72 y el control *L. fermentum* ATCC 9338 no mostraron actividad de la enzima BSH, probablemente presenta actividad frente a otros sustratos como taurodeoxicolato de sodio o no poseen el gen, el cual se trasfiere de forma horizontal entre cepas de la misma especie (Elkins *et al.*, 2001). La cepa con mayor actividad total y específica fue K75; la cepa control *L. acidophilus* ATCC 4356, presentó las menores actividades.

El análisis estadístico mostró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las muestras al medir las proteínas totales, pero sí existen entre la actividad total y la actividad específica halladas, para un $\alpha = 0.05$ (Tabla 2).

Tabla 2
Actividad enzimática BSH.

Cepa	Actividad total (U mL ⁻¹)	Actividad específica (U mg ⁻¹)
1_1	N/A	N/A
K11	1.08 ± 0.13 ^a	1.41 ± 0.01 ^a
K72	N/A	N/A
K73	1.73 ± 0.22 ^a	3.20 ± 0.10 ^a
K75	2.02 ± 0.06 ^a	3.5 ± 0.10 ^a
<i>L. fermentum</i> ATCC 9338	N/A	N/A
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	1.02 ± 0.09 ^a	1.54 ± 0.14 ^a

^a Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas para $\alpha=0.05$.

Las sales biliares son uno de los principales compuestos de la bilis y el producto final de la degradación del colesterol. Durante su tránsito por el intestino, entre el 5 y 10% de las sales biliares son desconjugadas por la acción de la enzima BSH, producida intracelularmente por los microorganismos pertenecientes a la flora intestinal, el ser humano no es capaz de producir la enzima (Jeun *et al.*, 2010). Al existir mayor cantidad de microorganismos productores de la enzima BSH, como las cepas estudiadas, habrá mayor influencia sobre el metabolismo del colesterol y posterior reducción de colesterol sérico (Huang *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos son comparables a los reportados por Liong y Shah (2005), obteniendo actividades enzimáticas superiores al comparar los valores de la cepa control *L. acidophilus* ATCC 4356, que mostró ser la de menor actividad enzimática, 0.45 ± 0.22 U mL⁻¹; en este estudio se observó la misma cepa con actividad de 1.02 ± 0.09 U mL⁻¹; esto puede deberse a las modificaciones realizadas a la técnica para medición de aminoácidos.

Adsorción de colesterol

Las cinco cepas presentaron la capacidad de adsorber el colesterol en diferentes proporciones, siendo concordante con el análisis estadístico que mostró diferencias estadísticamente significativas entre las muestras con un $\alpha=0.05$. La cepa que adsorbió en mayor porcentaje el colesterol ($70 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) presente en el medio de cultivo fue K73 y la de menor capacidad de adsorción fue K75. La totalidad de las cepas evaluadas adsorbieron el colesterol en diferentes proporciones: la K73 removiendo un $53.06 \pm 2.69 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ del medio de cultivo y la de menor capacidad fue K75 removiendo $7.23 \pm 2.69 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Los resultados muestran que no existe relación entre la actividad enzimática y la capacidad de adsorber el colesterol entre las cepas estudiadas. La capacidad de adsorber el colesterol es un proceso físico y se ve limitado por las necesidades de

fortalecimiento de la membrana dadas por la adversidad del medio (Kimoto *et al.*, 2002), razón por la cual se hace mayor énfasis en este estudio a la producción enzimática; aun así, microorganismos con ambas capacidades tendrían un mayor efecto sobre los niveles de colesterol del hospedero, puesto que se vería tratado por dos mecanismos complementarios.

4. Conclusiones

El estudio mostró que la cepa con mayor potencial hipocolesterolémico y con más características probióticas, asiladas a partir de suero costeño colombiano, fue K73. Éste resultado constituye una alternativa para personas que presentando niveles altos de colesterol sérico se encuentran en riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares.

Referencias bibliográficas

- Bao, Y.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Wang, S.; Dong, X.; Wang, Y.; Zhang, H. 2010. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control* 21(5): 695-701.
- Belviso, S.; Giordano, M.; Dolci, P.; Zeppa, G. 2009. In vitro cholesterol-lowering activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* strains isolated from the Italian Castelmagno PDO cheese. *Dairy Science Technology* 89(2): 169-176.
- Cueto, C.; García, D.; Garcés, F.; Cruz, J. 2007. Preliminary studies on the microbiological characterization of lactic acid bacteria in Suero costeño, a Colombian traditional fermented milk product. *Revista latinoamericana de microbiología* 49: 11-17.
- Elkins, C. A.; Moser, S. A.; Savage, D.C. 2001. Genes encoding bile salt hydrolases and conjugated bile salt transporters in *Lactobacillus johnsonii* 100-100 and other *Lactobacillus* species. *Microbiology* 147(12): 3403-3412.
- Gardiner, G. E.; Heinemann, C.; Bruce, A. W.; Beuerman, D.; Reid, G. 2002. Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but not *L. rhamnosus* GG in the human vagina as demonstrated by randomly amplified polymorphic DNA. *Clinical and Vaccine Immunology* 9(1): 92-96.
- Guo, X. H.; Kim, J. M.; Nam, H. M.; Park, S.Y. 2010. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe* 16(4): 321-326.

- Huang, X.; Auinger, P.; Eberly, S.; Oakes, D.; Schwarzschild, M.; Ascherio, A.; Investigators, P. S. G. D. 2011. Serum cholesterol and the progression of Parkinson's disease: results from DATATOP. *PLoS One*, 6(8), e22854.
- Hummel, A.; Hertel, C.; Holzapfel, W.; Franz, C. 2007. Antibiotic Resistances of Starter and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (3): 730–739.
- Jeun, J.; Kim, S.; Cho, S.Y.; Jun, H.; Park, H.J.; Seo, J.G.; Lee, S.J. 2010. Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice. *Nutrition* 26(3): 321-330.
- Kimoto, H.; Ohmomo, S.; Okamoto, T. 2002. Cholesterol removal from media by lactococci. *Journal of dairy science* 85(12): 3182-3188.
- Liong, M.T.; Shah, N.P. 2005. Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. *International Dairy Journal* 15(4): 391-398.
- Lye, H.S.; Rusul, G.; Liang, M.T. 2010. Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *Journal of Dairy Science* 93(4): 1383-1392.
- Ministerio de la Protección Social. República de Colombia 2007. Situación de Salud en Colombia Indicadores Básicos. Disponible en: <http://www.minproteccionsocial.gov.co/VBeContent/NewsDetail.asp?ID=15895&IDCompany=3>.
- Mori, K.; Yamazaki, K.; Ishiyama, T.; Katsumata, M.; Kobayashi, K.; Kawai, Y.; Shinano, H. 1997. Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa. *Int J Syst Bacteriol* 47(1): 54-57.
- Pereira, D.I.A.; McCartney, A.L.; Gibson, G.R. 2003. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Applied and environmental microbiology* 69(8): 4743-4752.
- Ray, A.; Pultz, N.; Bhalla, A.; Aron, D.; Donskey, C. 2003. Coexistence of vancomycin-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* in the intestinal tracts of hospitalized patients. *Clin Infect Dis.* 37(7): 875-881.
- Roth, G. F; Mokdad S.; Aekplakorn A.; Hasegawa W.; Lim T. 2011. High total serum cholesterol, medication coverage and therapeutic control: an analysis of national health examination survey data from eight countries. *Bulletin of the World Health Organization* 89: 92-101.
- Urbanska, A.M., Chen, H., Prakash, S. 2007. Investigation of microencapsulated BSH active *Lactobacillus* in the simulated human GI tract. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 13684.
- Vizoso-Pinto, M.G.; Franz, C.M.A.P.; Schillinger, U.; Holzapfel, W.H. 2006. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International journal of food microbiology* 109(3): 205-214.